

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-121199

(P2002-121199A)

(43) 公開日 平成14年4月23日 (2002. 4. 23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	5/083	C 0 7 K 5/083	4 B 0 1 8
A 2 3 J	1/04	A 2 3 J 1/04	4 B 0 6 4
A 2 3 L	1/305	A 2 3 L 1/305	4 C 0 8 4
C 1 2 N	9/99	C 1 2 N 9/99	4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P 21/02	B
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-313049(P2000-313049)

(22) 出願日 平成12年10月13日 (2000. 10. 13)

(71) 出願人 391022887

株式会社シマヤ

山口県新南陽市福川3丁目8-31

(72) 発明者 針生 仁

京都府京都市北区紫竹下園生町51

(72) 発明者 飛鳥井 雅倫

山口県新南陽市新地町7-2

(72) 発明者 赤羽 義章

福井県小浜市一番町6-3 大学雲浜公舎  
A-201

(74) 代理人 100067828

弁理士 小谷 悦司 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ペプチドおよびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 安全性や呈味性の点で問題がなく、且つ経済性をも満足することができ、食品として常時摂取することができ、しかも高血圧の予防乃至治療のためのACE活性阻害剤として有効に作用する有用な新規なペプチド、およびこうしたペプチドを製造する為の有用な方法を提供する。

【解決手段】 本発明の新規ペプチドは、(1) Val-Glu-Met、(2) Val-Glu-Ala、(3) Ala-Leu-Trpのいずれかのペプチド鎖を有するものであり、このペプチドは上記のペプチド鎖をペプチド構成成分として有する蛋白含有物質中の蛋白質に、エンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼを組合わせて作用させ、前記蛋白質を加水分解することによって得られる。

(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Val-Glu-Metよりなる新規ペプチド。

【請求項2】 Val-Glu-Alaよりなる新規ペプチド。

【請求項3】 Ala-Leu-Trpよりなる新規ペプチド。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載のペプチド鎖をペプチド構成成分として有する蛋白含有物質中の蛋白質に、エンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼを組合わせて作用させ、前記蛋白質を加水分解することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の新規ペプチドの製造方法。

【請求項5】 蛋白含有物質として魚肉を使用する請求項4記載の製造方法。

【請求項6】 蛋白含有物質として鰹節を使用する請求項4記載の製造方法。

【請求項7】 蛋白含有物質として鰹煮汁を使用する請求項4記載の製造方法。

【請求項8】 請求項1～3にいずれかに記載のペプチドを含有する食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アンギオテンシン変換酵素に対して阻害剤として作用する新規ペプチド、およびこの様なペプチドを製造する為の有用な方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】アンギオテンシン変換酵素（以下、「ACE」と略記する）は、肺血管内皮細胞膜、腎尿管や小腸の刷子縁膜に豊富に存在する他、生体内に広く分布しており、血圧降下に影響を及ぼす重要な酵素として知られている。即ち、この酵素は、アンギオテンシンI (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)を、強力な昇圧（血圧上昇）ペプチドであるアンギオテンシンIIに変換する作用を有するとともに、降圧（血圧降下）ペプチドであるブラジキニンを不活性化作用を有し、これによって血圧を上昇させるものである。従って、ACEの酵素活性を阻害する物質（以下、「ACE活性阻害剤」と呼ぶ）は、血圧上昇を抑制するものと考えられる。

【0003】ところで、急速に進む高齢化社会の中で、循環器系の疾患の予防が急務とされ、高血圧症はその引き金となることから、高血圧症の予防乃至治療のために、上記ACE活性阻害剤の研究開発が要望されている。特に、高血圧症は、食塩摂取量の多い日本人にとって最も罹患率の高い疾患の一つであり、その予防乃至治療のために有効なACE活性阻害剤の開発が切望されている。

【0004】ACE活性阻害剤としては、例えばカプト

2

プリル等の合成物質が知られており、既に医薬品として実用化されている。またACE活性阻害剤の新しい合成研究も盛んに進められている。しかしながら、こうした合成物質では、毒性や安全性の点で不明な点も多く、こうした問題が生じないことが予想される天然物由来のACE活性阻害剤の開発も検討されている。

【0005】上記の様な天然物由来のACE活性阻害剤としては、蛇毒ペプチドが知られているが、ACEに対する阻害作用が弱く実用的ではないという問題がある。こうしたことから、各種の天然物（特に天然蛋白質）を原料とした有効成分の検索が様々行なわれている。

【0006】こうした技術として、例えば特開平6-1191号や特開昭60-23086号等には、牛乳や牛等のカゼイン由来のペプチドがACE活性阻害剤として開示されており、特開平4-282400号には、乳清タンパク質由来のペプチドがACE活性阻害剤として開示されている。また、特開平5-112465号や特公平7-116233号には、鰹節や鰹由来のペプチドがACE活性阻害剤として開示されており、特公平7-119234号には、オキアミ由来のペプチドがACE活性阻害剤として開示されている。更に、特公平7-119234号には、鯖や鯖由来のペプチドがACE活性阻害剤として開示されている。とりわけ魚肉は日本人に馴染み深いものであるが、こうした魚肉を原料としたペプチドでは呈味面での問題がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明はこうした状況の下でなされたものであって、その目的は、安全性や呈味性の点で問題がなく、且つ経済性をも満足することができ、食品として常時摂取することができ、しかも高血圧の予防乃至治療のためのACE活性阻害剤として有効に作用する有用な新規なペプチド、およびこうしたペプチドを製造する為の有用な方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成し得た本発明のペプチドとは、下記（1）～（3）のいずれかのアミノ酸配列を有するものである。

（1）Val-Glu-Met

（2）Val-Glu-Ala

（3）Ala-Leu-Trp

【0009】尚、上記において、Valはバリン、Gluはグルタミン酸、Metはメチオニン、Alaはアラニン、Leuはロイシン、Trpはトリプトファンを夫々意味し、これらのアミノ酸はいずれも立体構造がL体である。

【0010】上記の様なペプチドを製造するに当たっては、上記（1）～（3）のいずれかのペプチド鎖をペプチド構成として有する蛋白含有物質中の蛋白質に、エンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼを組合わせて作用させ、前記蛋白質を加水分解する様にすれば良い。

(3)

3

【0011】また、上記本発明の製造方法において、原料として用いる蛋白含有物質としては、(a) 魚肉、(b) 鰹節、(c) 鰹煮汁等が挙げられる。

【0012】更に、本発明のペプチドは、安全性や呈味性の点で問題がなく、食品として常時摂取することができるので、こうしたペプチドを含有させた食品として有用に使用できる。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明者らは、多種の天然資源についてこれを素材とし、ACE活性阻害剤となり得るペプチドの開発について様々な角度から検討した。その結果、日本人に馴染み深い魚肉、特に鰹節や鰹煮汁を或る種の酵素を組み合わせ加水分解すれば、上記目的に適う優れたACE活性阻害を有する新規なペプチドを見出し、本発明を完成するに至った。

【0014】本発明に係る新規ペプチドは、そのアミノ酸配列に基づいて、各アミノ酸を順次ペプチド結合反応させたり、適当な複数のフラグメントを合成後、これらを結合させる慣用的な化学合成法（液相法や固相法）によっても製造できるが、より好ましくは、これらのペプチド鎖をペプチド構成として有する蛋白質原料（蛋白含有物質）をエンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼを組み合わせ作用させ、含有する蛋白質を加水分解する方法（酵素処理法）によって製造するのが良い。

【0015】上記の様な酵素処理法において、原料として用いる蛋白含有物質は、魚肉が代表的なものとして挙げられるが、これに限らず本発明のアミノ酸配列（ペプチド鎖）をペプチド構成として有するものであれば、有効に利用することができる。また、魚肉の中でも特に鰹節（宗田鰹節も含む）は風味や呈味性の面で好ましい蛋白質含有物質である。更に、鰹を缶詰や鰹節等に加工するときの加熱殺菌時に生じる煮汁（即ち、鰹煮汁）も安価な蛋白質含有物質として有用である。

【0016】次に、本発明のペプチドを酵素処理法によって製造する手順について説明する。原料としての蛋白含有物質は、使用目的により加工処理された後各種固液分離法により固形部分と液部分とに分画される。例えば、だし原料である鰹節の場合には、熱水抽出後、各種の固液分離法により抽出液画分と不溶性の残渣画分に分別される。或は、鰹節の香气成分の抽出に行われるアルコール抽出後、各種の固液分離法により香气成分を含むアルコール抽出画分と残渣画分に分別される。一方、かつお煮汁を用いる場合には、目的に応じて、精製・濃縮されるが、各段階で水溶性画分と非水溶性画分とに分別される。

【0017】本発明方法では、上記の様にして得られた残渣画分若しくは非水溶性画分（以下、残渣画分で代表する）に、エンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼを組み合わせ作用させ、残渣画分中に含まれる蛋白質を加水分解することによって、本発明ペプチドを豊富

4

に生成させることができる。但し、本発明方法では上記手順に限らず、蛋白含有物質に対して固液分離を行わずにエンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼを組み合わせ作用させ、本発明ペプチドを生成させた後固液分離を行ない、その後不溶性残渣を除去する様にしても良い。

【0018】蛋白含有物質から分別された残渣画分は、必要に応じて水を加えた後、HCl等の酸やNaOH等のアルカリによってpHを該酵素の至適範囲内に調整され、最初にエンド型プロテアーゼを加え、0.25～4時間後、好ましくは、0.4～1.5時間程度反応させる。その後、必要に応じて酸またはアルカリによってpHを次に添加するエキソ型ペプチダーゼの至適範囲内に調整し、エキソ型プロテアーゼを加え、酵素反応を2～72時間、好ましくは3～24時間行なう。このときの反応温度は、該酵素の至適温度の範囲で実施する。酵素反応終了後、90℃で0.5～15分程度加熱することにより酵素を失活させる。

【0019】ところで、各種の固液分離操作によって溶液部分を得ることができるが、これらの溶液部分は単独でまたは最初の抽出液画分と混合して、本発明のペプチドを豊富に含む原料溶液として利用できる。一方、同様に、蛋白含有物質に対して固液分離を行わずに、エンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼを作用させてから酵素を失活し、その後固液分離を行なって残渣を除去し、得られた溶液部分画分も本発明のペプチドを豊富に含むので、有効に利用することができる。このとき生成した残渣画分は更に蛋白質分解酵素を加えて加水分解を行ない、固液分離した後その溶液部分を利用することもできる。また同様の操作を繰り返すこともできる。

【0020】本発明で使用するエンド型プロテアーゼとしては、例えばアルカラーゼ（商品名：ノボノルディスクバイオインダストリー社製）を初め、Neutrase（商品名：ノボノルディスクバイオインダストリー社製）、各種オリエンターゼ（商品名：阪急共栄物産製）、ヌクレイシン（商品名：阪急共栄物産製）、ニューラーゼF、プロテアーゼS「アマノ」、プロテアーゼN「アマノ」、プロレザーFG-F、パパインW-40（商品名：いずれも天野製薬製）、プロチンA（商品名：大和化成製）等が挙げられる。このエンド型プロテアーゼは、蛋白質内部のペプチド結合に作用し、これを断片化する酵素であり、こうした酵素をまず作用させることによって、蛋白質の堅固で長鎖のアミノ酸配列が柔軟でより短鎖なアミノ酸配列に変わり、次段階の酵素反応を容易にするものである。

【0021】一方、本発明で使用するエキソ型ペプチダーゼとしては、例えばウミザイム、プロテアーゼM「アマノ」、ペプチダーゼR（商品名：いずれも天野製薬製）、プロチンA（大和化成製）等が挙げられる。このエキソ型ペプチダーゼは、ペプチドのN末端またはC

50

5

末端に作用し、末端アミノ酸若しくはペプチドを逐次遊離する酵素であり、こうした酵素を作用させることによって、多数の低分子量のペプチドが生成し旨味と溶解成分を増大することになる。即ち、エンドプロテアーゼとエキソペプチダーゼの適切な組合せを反応条件として選択することによって、苦味が少なく旨味の多い呈味性に優れた酵素分解物を得ることができるのである。

【0022】尚、フレーバーザイム（ノボノルディスクバイオインダストリー社製）、プロテアーゼA「アマノ」G、プロテアーゼP「アマノ」（商品名：いずれも天野製薬製）等のように、エンド型プロテアーゼとエキソ型ペプチダーゼの混在した複合型蛋白質分解酵素は、単独でもまた必要に応じてエンド型プロテアーゼまたはエキソ型ペプチダーゼを更に加えて、使用することができる。

【0023】上記の様な酵素によって処理して得られる溶液は、本発明のペプチドを豊富に含んだものとなり、このペプチドは優れたACE活性阻害を有するため、そのままACE活性阻害剤として利用することもできる。上記溶液より常法に従って、遠心分離、抽出、濃縮、乾固、限外濾過、塩析、エチルアルコール沈殿、各種クロマトグラフィー操作（イオン交換、ゲル濾過、逆相、順相、アフィニティ等）等を行うことにより、単離精製することができ、この精製された形態でACE活性阻害剤として利用することもできる。

【0024】上記の如くして得られる本発明のペプチドは、(1) Val-Glu-Met、(2) Val-Glu-Ala、(3) Ala-Leu-Trp（但し、Val：バリン、Glu：グルタミン酸、Met：メチオニン、Ala：アラニン、Leu：ロイシン、Trp：トリプトファンを夫々示す）で表されるアミノ酸配列を有する新規なペプチドであり、そのアミノ酸配列に基いて、特有のACE活性阻害を有している。

【0025】ACE活性阻害特性は、例えばCushmanの方法[D. W. Cushman, H. S. Cheung, Biochemical, Pharmacology, 20, 1637, (1971)]を改良した斉藤らの方法[斎藤義幸、今安聡、日本農芸化学会誌, Vol. 66, No. 7, 1081, (1992)]に従って求められる。即ち、前記ペプチドを含む試料60μlと、0.1U/mlのACE溶液（シグマ社製）30μlを、予め37℃で3分間インキュベートし、これに基質として0.1Mホウ酸緩衝液（0.3M NaClを含む、pH 8.3の溶液）を用いて6.5mMに調整したHip-His-Leu（シグマ社製）300μlを添加して反応を開始させ、37℃で60分間反応後、反応物中に1N-HCl：250μlを加えて反応を停止させる。次いで、酢酸エチル1.5mlを加えて15秒間攪拌する。更に、3000回転で10分間遠心して酢酸エチル層1.0mlを採取し、蒸発乾固後、1M-NaCl水溶液3.0mlを加え、抽出されたヒプリル酸の228nmにおける吸光度を測定し、こ

(4)

6

れをACE活性阻害特性とした。このとき、盲検としては、ACE溶液を加える前に、1N-HClを加え同様に処理したものをを用いた。また、ACE活性阻害率を下記式より算出した。

$$\text{ACE活性阻害率 (\%)} = [(A-B) / (A-C)] \times 100 (\%)$$

A：試料の代わりに蒸留水を添加した場合の228nmの吸光度

B：試料を添加した場合の228nmの吸光度

10 C：反応開始前に予め1N-HClを添加した場合の228nm吸光度

【0026】またペプチド量の測定は、Lowryらの方法[O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Randall, Journal of Biological Chemistry, 193, 265, (1951)]に従って行なった。検量線は、牛血清グロブリン（和光純薬工業社製）を用いて作成した。ACE活性阻害率は、「IC50」を用いて表すものとし、このIC50の値は、上記測定法において、ACEの酵素活性を50%阻害するのに必要な試料の濃度を示している。

20 【0027】本発明のペプチドは、安全性や呈味性の点で問題がなく、食品として常時摂取することができるので、こうしたペプチドを含有させた食品形態として使用できるものであるが、こうしたペプチドを有効成分として含有する医薬製剤としても有効に使用できるものである。

【0028】医薬製剤の形態で本発明のペプチドを使用する場合には、通常、適当な製剤担体を用いて、常法に従い適宜の医薬製剤組成物の形態に調製されて実用化できる。この製剤担体としては、製剤の使用形態に応じて、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や、賦形剤を例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用できる。

【0029】医薬製剤の投与形態は、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表なものとしては錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）等が挙げられる。錠剤の形態に成形するに際しては、上記製剤担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ素、リン酸カリウム等の賦形剤、水、エチルアルコール、プロピルアルコール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム等の崩壊剤、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エ

50

(5)

7

ステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド等の界面活性剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用できる。錠剤には、必要に応じて通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠あるいは二重錠、多層錠とすることができる。

【0030】丸剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エチルアルコール等の結合剤、ラミナラン、カンテン等の崩壊剤等を使用できる。坐剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセリド等を使用できる。カプセル剤は、常法に従い通常本発明の有効成分化合物を上記で例示した各種の製剤担体と混合して硬質ゼラチンカプセル、軟質ゼラチンカプセル等に充填して調整される。また、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を含有させることもできる。

【0031】医薬製剤の形態が液剤、乳剤、懸濁剤等の注射剤として調製される場合には、これらは殺菌され且つ血液と等張であるのが好ましく、その一形態に調製するに際しては、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用できる。尚、この場合等張性の溶液を調整するに充分な量の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを医薬製剤中に含有させてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。

【0032】医薬製剤の形態で本発明のペプチドを使用する場合に、該製剤中に含有されるべき有効成分（ペプチド）の量は、特に限定されず適宜選択されるが、通常0.1～60重量%程度が適当である。

【0033】上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度等に応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤は経口投与され、注射剤は単独でまたはブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じて単独で筋肉内、皮内、皮下若しくは腹腔内投与され、坐剤は直腸内投与される。

【0034】医薬製剤としての投与量は、その用法、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度により適宜選

8

択されるが、通常有効成分である本発明ペプチドの量が、1日当たり体重1kg当たり約0.5～20mg程度が適当であり、該製剤は1日に1～4回に分けて投与することができる。

【0035】一方、本発明のペプチドを食品形態として実用化するに当たっては、適当な可食素材を用いて、一般的方法に従い、例えば固形剤、液剤等の適当な各種食品形態に賦形することができ、また通常の食品素材や加工食品中にはその適当量を添加することもできる。その摂取量は、特に限定されず、前記医薬製剤での投与量を目安として適宜決定できる。このとき用いる固形剤としては、だし製品、和風調味料、即席味噌汁、和風スープ、飲料等が挙げられ、液剤としては、液体だし、めんつゆ類、液体調味料、和風スープ、液体飲料等が挙げられる。また、うどん、そば、スパゲッティ等の小麦粉を原料とする素材へ練り込むことや、魚肉等の練製品、各種焼菓子、カレーを始めとしたレトルト製品等へ適量添加することもできる。

【0036】医薬製剤および食品形態で本発明のペプチドを使用することによって、そのACE活性阻害作用によって、血圧降下、ブラジキニン不活性化抑制等の効果を発揮するので、本態性高血圧、腎性高血圧、副腎性高血圧等の各種高血圧の予防乃至治療に有効である。また、本発明のペプチドは、これら疾患の診断や病態の治療等に用いられる血圧降下剤、狭心症発作の閾値上昇、心筋梗塞の減少、鬱血性心不全改善剤、糖尿病治療食等としても利用できる。

【0037】次に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、下記実施例は本発明を限定する性質のものではなく、前・後記の趣旨に徴して設計変更することはいずれも本発明の技術的範囲に含まれるものである。

#### 【0038】

##### 【実施例】実施例1

銚節10gに水90mlを加えて十分ホモジナイスし、100℃で15分間煮沸後、放置した。その後、NaOHでpHを8.0に調整した後、ノボノルディスクバイオインダストリー社製のエンド型プロテアーゼであるアルカラゼ〔フードグレード（商品名）〕を35mg添加し、55℃で0.5時間加水分解を行なった。

【0039】引き続き、ノボノルディスクバイオインダストリー社製のエンド型プロテアーゼとエキソ型ペプターゼが混在する複合型酵素であるフレーバーザイム（商品名）を100mg添加し、55℃で16時間酵素反応を行なった。その後、90℃で5分間加熱して酵素を失活させた。

【0040】冷却後遠心分離して不溶性残渣部分を除去し、溶液部分を濃縮し、高速液体クロマトグラフィー（イオン交換、ゲル濾過、pH、CH、およびODS-カラム）によりペプチドを得た。更に、精製・単離し、単一物質である3つのピークを確認した。単離され

(6)

9

た3つの物質を、気相プロテインシーケンサー（パーキンエルマー社製）を用い自動エドマン分解法を適応してアミノ酸配列を分析し下記の構造を得た。

配列番号1. Val-Glu-Met

配列番号2. Val-Glu-Ala

配列番号3. Ala-Leu-Trp

配列番号1～3の各ペプチドにおけるACE活性阻害率を前記した方法で測定した。得られた3つのペプチドを別途に化学合成し、その挙動、活性等をODSカラムを用いて比較検討した。その結果、合成されたペプチドは上記で得られたペプチドとほぼ同一であることが確認できた。その結果を、下記表1に示す。

【0041】

【表1】

配列番号	アミノ酸配列	IC50(μg/ml)	
		単離品	合成品
1	Val-Glu-Met	68.58	71.27
2	Val-Glu-Ala	78.61	77.56
3	Ala-Leu-Trp	158.34	163.54

#### 【0042】実施例2

鰹煮汁100mlを十分ホモジナイズし、100℃で15分間煮沸後放置した。NaOHでpH8.0に調整した後、エンド型プロテアーゼであるプロテアーゼS（商品名：天野製薬製）を10mg加え、45℃で3時間加水分解した。引き続き、エキソ型ペプチダーゼであるウマミザイム（商品名：天野製薬製）を20mg加えて、50℃で6時間酵素反応を行った。

【0043】90℃で15分間加熱し酵素を失活させた後、冷却し遠心分離により不溶性残渣部分を除去し溶液部分を濃縮し、以下実施例1と同様にして3つのペプチドを精製・単離した。得られた3つのペプチドは、上記の配列番号1～3のものであることを確認した。

#### 【0044】実施例3

鰹節10gを粉碎した後、水90mlを加え、97℃で30分間加熱した。冷却後遠心分離して抽出液と残渣部分とに分離した。残渣部分に水80mlを加えた後、NaOHを添加することによってpH8.0に調整し、アルカラーゼ（商品名：ノボノルディスクバイオインダストリー社製）を30mg添加し、55℃で0.5時間反応させた。

【0045】引き続き、フレーバーザイム（商品名：ノボノルディスクバイオインダストリー社製）を70mg添加し、55℃で8時間加水分解した。90℃で5分間加熱し、酵素を失活させた後、冷却し遠心分離により不溶性部分を除去し、溶液部分を濃縮後、実施例1と同様にしてペプチドを精製・単離した。得られた3つのペプチドは、上記配列番号1～3のものであることを確認した。

10

#### 【0046】実施例4

50メッシュ以下に粉碎した鰹節10gに、70%エチルアルコールを60ml加えて12時間放置した。圧搾濾過によりエチルアルコール抽出液と残渣部分とに分別した。残渣部分に水80mlを加えた後、NaOH添加によりpH8.0に調整した後、プロテアーゼS（商品名：天野製薬製）を60mg加えて50℃で4時間加水分解した。

【0047】更に、ウマミザイム（商品名：天野製薬製）を5mg加えて6時間反応を行なった。90℃で15分間加熱し、酵素を失活させた後、冷却し遠心分離により不溶性部分を除去し、溶液部分を濃縮し、実施例1と同様にして3つのペプチドを精製・単離した。得られた3つのペプチドは、配列番号1～3であることを確認した。

#### 【0048】実施例5

実施例3の条件に従い、鰹節1kgを粉碎後9リットルの水を加え、97℃で30分間加熱した。冷却後遠心分離し、抽出液（A）と残渣部分（B）に分離した。

【0049】残渣部分（B）に水8リットルを加えた後、NaOHを添加してpH8.0に調整し、アルカラーゼ（商品名：ノボノルディスクバイオインダストリー社製）を3g添加し、55℃で0.5時間反応させた。

【0050】引き続き、フレーバーザイム（商品名：ノボノルディスクバイオインダストリー社製）を7g添加し、55℃で8時間加水分解した。90℃で5分間加熱し、酵素を失活させた後、冷却し遠心分離により不溶性部分を除去した。

【0051】得られた酵素抽出液と前記抽出液（A）とを混合して、蛋白質濃度が3.0%の鰹節抽出液（C）を15リットル得た。得られた抽出液（C）には、上記の3つのペプチドが豊富に含まれてることを確認した。

【0052】上記抽出液（C）1リットルを、凍結乾燥して蛋白質濃度が約85%の粉末品35gを得た。この凍結乾燥粉末35gに対して、グルタミン酸ナトリウム粉末105gおよびイノシン酸10gを加えて十分に混合した。この混合物は、良好な鰹の香りのする澄明で旨味に富んだ調味料粉末品であった。

【0053】次に、上記抽出液（C）70mlに対して醤油200ml、みりん200ml、水1リットルを加えて十分に攪拌し、弱火で煮、一煮立ちさせめんつゆ液を調合した。得られためんつゆ液は、香りとだしの良く効いた美味しいめんつゆであった。

#### 【0054】

【発明の効果】本発明は以上の様に構成されており、安全性や呈味性の点で問題がなく、且つ経済性をも満足することができ、食品として常時摂取することができ、しかも高血圧の予防乃至治療のためのACE活性阻害剤として有効に作用する有用な新規なペプチドが得られた。

(7)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
// A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/12		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	A 6 1 K 37/02	
(72) 発明者 伊藤 光史		F ターム(参考)	4B018 LE05 MD20 MD74 ME04 MF12
福井県小浜市福谷25-13-2 大学福谷公			4B064 AG21 CA21 CC03 CD21 DA01
舎101			4C084 AA02 AA07 BA15 ZA422
			ZC172
			4H045 AA10 AA20 AA30 BA12 CA52
			DA57 EA23 FA16 GA15 GA23
			GA25